

(19)日本国特許庁 (JP)

(12) 公開特許公報 (A)

(11)特許出願公開番号

特開2001-13103

(P2001-13103A)

(43)公開日 平成13年1月19日 (2001.1.19)

(51)Int.Cl.^{*}
G 0 1 N 27/416
C 1 2 M 1/00
C 1 2 N 15/09
C 1 2 Q 1/68
G 0 1 N 33/53

識別記号

F I
C 0 1 N 27/46
C 1 2 M 1/00
C 1 2 Q 1/68
G 0 1 N 33/53
33/566

デーマコード^{*}(参考)

3 3 6 M
Λ
Λ
M

審査請求 未請求 請求項の数10 O L (全 14 頁) 最終頁に続く

(21)出願番号 特願2000-130091(P2000-130091)
(22)出願日 平成12年4月28日(2000.4.28)
(31)優先権主張番号 特願平11-121563
(32)優先日 平成11年4月28日(1999.4.28)
(33)優先権主張国 日本 (JP)

(71)出願人 000005201
富士写真フィルム株式会社
神奈川県南足柄市中沼210番地
(72)発明者 牧野 快彦
埼玉県朝霞市泉水3-11-46 富士写真フィルム株式会社内
(72)発明者 阿部 義彦
埼玉県朝霞市泉水3-11-46 富士写真フィルム株式会社内
(74)代理人 100074675
弁理士 柳川 泰男

最終頁に続く

(54)【発明の名称】走査型電気化学顕微鏡による試料核酸断片の検出方法および定量方法

(57)【要約】

【課題】DNA分析素子およびPNA分析素子を用いて、析素子表面に固定されたDNA断片、PNA断片に相補性を有する試料核酸断片をそれぞれ感度よく検出する方法および定量する方法を提供すること。

【解決手段】基板表面に区画された複数の領域のそれぞれにDNA断片又はPNA断片が固定されてなるDNA分析素子又はPNA分析素子に、試料核酸断片を含む水性液をハイブリッドDNA結合性電気化学活性分子又はハイブリッドPNA結合性電気化学活性分子の存在下に接触させることにより、該分析素子に固定されているDNA断片又はPNA断片と相補性を有する試料核酸断片を結合させると共に、該電気化学活性分子をも結合させ；走査型電気化学顕微鏡によって分析素子表面に電位を付与しながら；分析素子表面の該電気化学活性分子結合領域に発生する電流を測定する、相補性を有する試料核酸断片の検出方法および定量方法。

【特許請求の範囲】

【請求項1】 基板表面に区画された複数の領域のそれぞれにDNA断片が固定されてなるDNA分析素子に、試料核酸断片が溶解もしくは分散してなる水性液をハイブリッドDNA結合性電気化学活性分子の存在下に接触させることにより、該水性液中の、該分析素子に固定されているDNA断片と相補性を有する試料核酸断片を結合させると共に、該電気化学活性分子をも結合させ、次いで走査型電気化学顕微鏡によって、電位を付与しながら、分析素子表面の該電気化学活性分子結合領域に発生する電流を測定することを特徴とする、相補性を有する試料核酸断片の検出方法。

【請求項2】 (1) 基板表面に区画された複数の領域のそれぞれにDNA断片が固定されてなるDNA分析素子に、濃度が未知の、該分析素子に固定されているDNA断片と相補性を有する試料核酸断片が溶解あるいは分散されてなる試料水性液およびハイブリッドDNA結合性電気化学活性分子を接触させることにより、該試料水性液中の、該分析素子に固定されているDNA断片と相補性を有する試料核酸断片を結合させると共に、ハイブリッドDNA結合性電気化学活性分子をも結合させる工程；そして、(2) 該分析素子に走査型電気化学顕微鏡によって電位を付与し、該分析素子表面のハイブリッドDNA結合性電気化学活性分子結合領域に発生する電流を測定し、その電流の値を、上記と同一の試料核酸断片が溶解あるいは分散されてなる試料水性液の濃度と電流との関係を示す検量線と照合することによって、試料水性液中の相補性を有する試料核酸断片の濃度を求める工程を含むことを特徴とする、試料核酸断片の定量方法。

【請求項3】 上記(2)の工程で用いる検量線が、基板表面に区画された複数の領域のそれぞれにDNA断片が固定されてなるDNA分析素子に、該分析素子に固定されているDNA断片と相補性を有する試料核酸断片を互いに異なる既知の濃度で含む試料核酸断片が溶解あるいは分散されてなる三点以上の各試料水性液をそれぞれ接触させることにより、該試料水性液中の、該分析素子に固定されているDNA断片と相補性を有する試料核酸断片を結合させると共に、ハイブリッドDNA結合性電気化学活性分子をも結合させ、次いで走査型電気化学顕微鏡によって電位を付与し、該分析素子表面のハイブリッドDNA結合性電気化学活性分子結合領域に発生する電流を測定することによって作成されたものであることを特徴とする請求項2に記載の定量方法。

【請求項4】 DNA断片が、その塩基配列が既知であることを特徴とする請求項1乃至3の内の何れかの項に記載の方法。

【請求項5】 ハイブリッドDNA結合性電気化学活性分子が、酸化還元活性を有するフェロセン修飾電気化学活性縫い込み型インターラーティーであることを特徴とする請求項1乃至3の内の何れかの項に記載の方法。

【請求項6】 基板表面に区画された複数の領域のそれぞれにPNA断片が固定されてなるPNA分析素子に、試料核酸断片が溶解もしくは分散してなる水性液をハイブリッドPNA結合性電気化学活性分子の存在下に接触させることにより、該水性液中の、該分析素子に固定されているPNA断片と相補性を有する試料核酸断片を結合させると共に、該電気化学活性分子をも結合させ、次いで走査型電気化学顕微鏡によって電位を付与し、分析素子表面の該電気化学活性分子結合領域に発生する電流を測定することを特徴とする、相補性を有する試料核酸断片の検出方法。

【請求項7】 (1) 基板表面に区画された複数の領域のそれぞれにPNA断片が固定されてなるPNA分析素子に、濃度が未知の、該分析素子に固定されているPNA断片と相補性を有する試料核酸断片が溶解あるいは分散されてなる試料水性液およびハイブリッドPNA結合性電気化学活性分子を接触させることにより、該試料水性液中の、該分析素子に固定されているPNA断片と相補性を有する試料核酸断片を結合させると共に、ハイブリッドPNA結合性電気化学活性分子をも結合させる工程；そして、(2) 該分析素子に走査型電気化学顕微鏡によって電位を付与し、該分析素子表面のハイブリッドPNA結合性電気化学活性分子結合領域に発生する電流を測定し、その電流の値を、上記と同一の試料核酸断片が溶解あるいは分散されてなる試料水性液の濃度と電流との関係を示す検量線と照合することによって、試料水性液中の相補性を有する試料核酸断片の濃度を求める工程を含むことを特徴とする、試料核酸断片の定量方法。

【請求項8】 上記(2)の工程で用いる検量線が、基板表面に区画された複数の領域のそれぞれにPNA断片が固定されてなるPNA分析素子に、該分析素子に固定されているPNA断片と相補性を有する試料核酸断片を互いに異なる既知の濃度で含む試料核酸断片が溶解あるいは分散されてなる三点以上の各試料水性液をそれぞれ接触させることにより、該試料水性液中の、該分析素子に固定されているPNA断片と相補性を有する試料核酸断片を結合させると共に、ハイブリッドPNA結合性電気化学活性分子をも結合させ、次いで走査型電気化学顕微鏡によって電位を付与し、該分析素子表面のハイブリッドPNA結合性電気化学活性分子結合領域に発生する電流を測定することによって作成されたものであることを特徴とする請求項2に記載の定量方法。

【請求項9】 PNA断片が、その塩基配列が既知であることを特徴とする請求項6乃至8の内の何れかの項に記載の方法。

【請求項10】 ハイブリッドPNA結合性電気化学活性分子が、酸化還元活性を有するフェロセン修飾電気化学活性縫い込み型インターラーティーであることを特徴とする請求項6乃至8の内の何れかの項に記載の方法。

【発明の詳細な説明】

【0001】

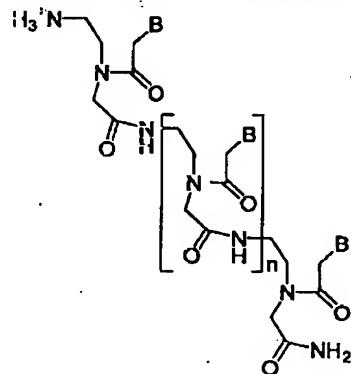
【発明の属する技術分野】本発明は、遺伝子の発現、変異、多型等の同時解析に非常に有用である、多数のDNA断片を基板表面に整列させたDNA分析素子、あるいは多数のPNA断片を基板表面に整列させたPNA分析素子を用いる、相補性を有する試料核酸断片の電気化学的な検出方法に関する。

【0002】

【従来の技術】試料中の目的とするDNA断片の検出は、そのDNA断片の塩基配列と相補性を有する既知のDNA断片を用いて、試料中のDNA断片と既知のDNA断片とで形成されるハイブリッドを、電気化学的な方法、蛍光法、ラジオアイソトープ法などによって検出すことにより行うのが一般的である。相補的な既知のDNA断片は、通常、固相担体に固定させて使用することから、「プローブ」あるいは「プローブDNA」と呼ばれる。プローブDNAを用いた試料DNA断片の検出方法は、病原菌の検出や遺伝子のスクリーニングに広く利用されている。

【0003】しかし、DNA断片は、負に荷電しており、プローブDNAと試料DNA断片との間に生じる電気的反発は、ハイブリダイゼーションを妨げ、検出感度を低下させる。このようなDNA断片の荷電は塩濃度が低い場合に顕著となるため、ハイブリダイゼーションは一定の濃度の塩が存在する緩衝液中で行うのが一般的である。

【0004】特開平9-288080号公報には、プローブDNAおよび電気化学活性縫い込み型インターラータを用いて、試料DNA断片を検出する方法が開示さ



PNA

【0008】このため、電気的には中性であり、塩の存在しない条件下でも荷電することがない。核酸塩基は、ポリアミド骨格に、通常、メチレンカルボニル基を介して結合している。PNAは、DNAと機能的にはほとんど同じと言っても、DNAと比較して、形成される二本鎖は安定であり、相補するDNAの塩基配列を厳密に認識することも明らかとなっている（杉本直巳、日本化学会第74回春季大会要旨集、1287頁）。アンチセンス医薬以外にも各種診断薬への応用が期待されている分

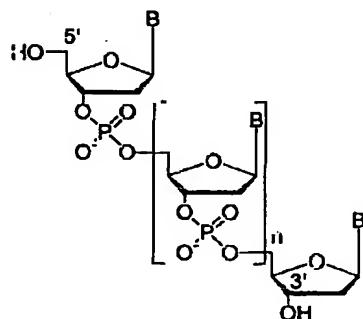
れている。この方法では、ハイブリッドに挿入された該インターラータが有する導電性基とプローブDNAとの間を流れる電流を測定することによって、試料DNA断片を検出するため、蛍光法に見られる褪色がなく、ラジオアイソトープ法における安全性の問題が解決できることに加え、試料DNA断片を直接標識する必要がない点で非常に優れた方法である。

【0005】しかし、この方法は、該インターラータがプローブDNAにもある程度結合することにより、測定のバックグラウンドに影響を与えるという点で、実用レベルを充分に満足できる方法とは言い難い。

【0006】一方、いわゆるアンチセンス分子、即ち、遺伝子が発現する際に、一本鎖になるDNAの転写領域もしくはRNAの翻訳領域に高選択的に結合させ、その領域の機能を制限する分子が遺伝子治療の分野におけるアンチセンス医薬として知られている。このアンチセンス分子としては、DNA（もしくはRNA）を模倣した物質として、PNA (peptide nucleic acid) が知られている。PNAは、DNA等と同様にその分子中に核酸塩基を有し、相補的な塩基配列を有するDNA等に特異的にハイブリダイズし、二本鎖を形成する（P.E.Nielsen et al., Science, 254, 1497-1500(1991)）。PNAは、このように、機能的にはDNAとほとんど変わりないが、その構造は全く異なり、N-(2-アミノエチル)グリシンを単位とするポリアミドを基本骨格としており、その分子中に糖およびリン酸を含まない。

【0007】

【化1】



DNA

子である（特表平6-509063号の明細書）。

【0009】PNAは、ペプチドと同様に液相法や固相法によって合成することができ、合成されたものは市販もされている。PNAの合成法については、特表平6-509063号の明細書、米国特許2758988号の明細書、P.E.Nielsen et al., Journal of American Chemical Society, 114, 1895-1987(1992)、P.E.Nielsen et al., Journal of American Chemical Society, 114, 9677-9678(1992)などに詳細が記載されている。

【0010】特開平11-332595号公報には、固相担体表面にPNA断片をそので固定してなるPNAプローブ、およびPNAプローブを用いるDNA断片の検出方法が開示されている。このPNAプローブは、アビジン-ビオチン法によって、表面プラズモン共鳴バイオセンサー用の測定チップにPNA断片を固定させたものである。そのPNAプローブを用いた目的とするDNA断片の検出は、表面プラズモン共鳴シグナルを測定することによって行なわれている。

【0011】また、PNAプローブ、および試料DNA断片をラジオアイソトープで標識した核酸断片を用いて、ハイブリッドの標識量を測定することによって、相補性を有する試料DNA断片を検出する方法も知られている(P.E.Nielsen et al., Science, 254, 1497-1500(1991))。

【0012】

【発明が解決しようとする課題】本発明は、DNA分析素子を用いて、分析素子表面に固定されたDNA断片に相補性を有する試料中の核酸断片、およびPNA分析素子を用いて、分析素子表面に固定されたPNA断片に相補性を有する試料中の核酸断片を感度よく検出する方法および定量する方法を提供することを、その課題とする。

【0013】

【課題を解決するための手段】本発明は、基板表面に区画された複数の領域のそれぞれにDNA断片が固定されてなるDNA分析素子に、試料核酸断片が溶解もしくは分散してなる水性液をハイブリッドDNA結合性電気化学活性分子の存在下に接触させることにより、該水性液中の、該分析素子に固定されているDNA断片と相補性を有する試料核酸断片を結合させると共に、該電気化学活性分子をも結合させ、次いで走査型電気化学顕微鏡によって、電位を付与しながら、分析素子表面の該電気化学活性分子結合領域に発生する電流を測定することを特徴とする、相補性を有する試料核酸断片の検出方法-A1にある。

【0014】本発明は、また、(1)基板表面に区画された複数の領域のそれぞれにDNA断片が固定されてなるDNA分析素子に、濃度が未知の、該分析素子に固定されているDNA断片と相補性を有する試料核酸断片が溶解あるいは分散してなる試料水性液およびハイブリッドDNA結合性電気化学活性分子を接触させることにより、該試料水性液中の、該分析素子に固定されているDNA断片と相補性を有する試料核酸断片を結合させると共に、ハイブリッドDNA結合性電気化学活性分子をも結合させる工程；そして、(2)該分析素子に走査型電気化学顕微鏡によって電位を付与し、該分析素子表面のハイブリッドDNA結合性電気化学活性分子結合領域に発生する電流を測定し、その電流の値を、上記と同一の試料核酸断片が溶解あるいは分散してなる試料水性

液の濃度と電流との関係を示す検量線と照合することによって、試料水性液中の相補性を有する試料核酸断片の濃度を求める工程を含むことを特徴とする、試料核酸断片の定量方法-A2にもある。

【0015】本発明の試料核酸断片の定量方法-A2の好ましい態様は、上記(2)の工程で用いる検量線が、基板表面に区画された複数の領域のそれぞれにDNA断片が固定されてなるDNA分析素子に、該分析素子に固定されているDNA断片と相補性を有する試料核酸断片を互いに異なる既知の濃度で含む試料核酸断片が溶解あるいは分散してなる三点以上の各試料水性液をそれぞれ接触させることにより、該試料水性液中の、該分析素子に固定されているDNA断片と相補性を有する試料核酸断片を結合させると共に、ハイブリッドDNA結合性電気化学活性分子をも結合させ、次いで走査型電気化学顕微鏡によって電位を付与し、該分析素子表面のハイブリッドDNA結合性電気化学活性分子結合領域に発生する電流を測定することによって作成されたものである。

【0016】本発明の相補性を有する試料核酸断片の検出方法-A1および試料核酸断片の定量方法-A2の好ましい態様は以下の通りである。

- (イ) DNA断片が、その塩基配列が既知である。
- (ロ) ハイブリッドDNA結合性電気化学活性分子が、酸化還元活性を有するフェロセン修飾電気化学活性縫い込み型インターラーケーである。

【0017】本発明は、さらに、基板表面に区画された複数の領域のそれぞれにPNA断片が固定されてなるPNA分析素子に、試料核酸断片が溶解もしくは分散してなる水性液をハイブリッドPNA結合性電気化学活性分子の存在下に接触させることにより、該水性液中の、該分析素子に固定されているPNA断片と相補性を有する試料核酸断片を結合させると共に、該電気化学活性分子をも結合させ、次いで走査型電気化学顕微鏡によって電位を付与し、分析素子表面の該電気化学活性分子結合領域に発生する電流を測定することを特徴とする、相補性を有する試料核酸断片の検出方法-B1にもある。

【0018】本発明は、さらにまた、(1)基板表面に区画された複数の領域のそれぞれにPNA断片が固定されてなるPNA分析素子に、濃度が未知の、該分析素子に固定されているPNA断片と相補性を有する試料核酸断片が溶解あるいは分散してなる試料水性液およびハイブリッドPNA結合性電気化学活性分子を接触させることにより、該試料水性液中の、該分析素子に固定されているPNA断片と相補性を有する試料核酸断片を結合させると共に、ハイブリッドPNA結合性電気化学活性分子をも結合させる工程；そして、(2)該分析素子に走査型電気化学顕微鏡によって電位を付与し、該分析素子表面のハイブリッドPNA結合性電気化学活性分子結合領域に発生する電流を測定し、その電流の値を、上記と同一の試料核酸断片が溶解あるいは分散してなる試

料水性液の濃度と電流との関係を示す検量線と照合することによって、試料水性液中の相補性を有する試料核酸断片の濃度を求める工程を含むことを特徴とする、試料核酸断片の定量方法-B2にもある。

【0019】本発明の試料核酸断片の定量方法-B1の好ましい態様は、上記(2)の工程で用いる検量線が、基板表面に区画された複数の領域のそれぞれにPNA断片が固定されてなるPNA分析素子に、該分析素子に固定されているPNA断片と相補性を有する試料核酸断片を互いに異なる既知の濃度で含む試料核酸断片が溶解あるいは分散されてなる三点以上の各試料水性液をそれぞれ接触させることにより、該試料水性液中の、該分析素子に固定されているPNA断片と相補性を有する試料核酸断片を結合させると共に、ハイブリッドPNA結合性電気化学活性分子をも結合させ、次いで走査型電気化学顕微鏡によって電位を付与し、該分析素子表面のハイブリッドPNA結合性電気化学活性分子結合領域に発生する電流を測定することによって作成されたものである。

【0020】本発明の相補性を有する試料核酸断片-B1の検出方法および試料核酸断片の定量方法-B2の好ましい態様は以下の通りである。

- (イ) PNA断片が、その塩基配列が既知である。
- (ロ) ハイブリッドPNA結合性電気化学活性分子が、酸化還元活性を有するフェロセン修飾電気化学活性縫い込み型インターラーティーである。

【0021】

【発明の実施の形態】図1に、本発明の代表的な試料核酸断片の検出方法-A1を示す。基板(21)の表面に区画された複数の領域のそれぞれにDNA断片(11)が固定されてなるDNA分析素子(31)に、試料核酸断片(12)が溶解あるいは分散してなる水性液を、ハイブリッドDNA結合性電気化学活性分子(41)の存在下に接触させる。該水性液中の、DNA断片(11)と相補性を有する試料核酸断片(12a)を結合させると共に、該電気化学活性分子(41)も結合させると、基板(21)に固定されている(11)と(12a)とで形成されるハイブリッドDNAに(41)が結合した複合体(51)を得ることができる。この(51)が固定された分析素子表面に走査型電気化学顕微鏡(61)を近接させ、電位を付与後、応答電流を測定することによって画像図(71)が得られる。(71)中の丸印は、基板(21)表面に区画された複数の領域を示し、その内で黒丸印は、応答電流が検出されたハイブリッドDNA結合性電気化学活性分子(41)の結合領域を示す。PNA分析素子は、DNA断片の代わりにPNA断片が、基板(21)の表面に区画された複数の領域のそれぞれに固定されてなる分析素子であり、そのPNA分析素子を用いる本発明の試料核酸断片の検出方法-B1は、DNA分析素子を用いる場合と同様である。

【0022】以下、本発明の試料核酸断片の検出方法-

A1およびその定量方法-A2の各構成要素について説明する。本発明の試料核酸断片の検出方法-B1およびその定量方法-B2についても特に断らない限り、A1およびA2と同様である。

【0023】以下、本明細書で用いる用語を次のように定義する。「ハイブリッドDNA」とは、DNA分析素子上に固定されているDNA断片と試料核酸断片とで形成される二本鎖断片をいう。「ハイブリッドPNA」とは、PNA分析素子上に固定されているPNA断片と試料核酸断片とで形成される二本鎖断片をいう。「PNA断片」とは、合成によって得られたPNAについて、切断等の操作によってその一部を断片化したものを含まない。「ハイブリッドDNA結合性電気化学活性分子」とは、DNA分析素子上に固定されたDNA断片とハイブリダイズする試料核酸断片の種類を問わず、形成されたハイブリッドに結合し、かつ電気化学活性を有するものをいう。但し、ハイブリッドDNA結合性電気化学活性分子は、形成されたハイブリッド以外に、一本鎖のDNA断片あるいは一本鎖の試料核酸断片にも一時的に結合することがある。「ハイブリッドPNA結合性電気化学活性分子」についても同様である。「結合」とは、ハイブリッドDNA結合性電気化学活性分子がハイブリッドDNAの構造内に挿入された状態、およびハイブリッドDNA構造外でハイブリッドDNAに静電気的に相互作用をしている状態をいう。尚、走査型電子顕微鏡による検出方法は、電気的な信号を検出するものではあるが、DNA分析素子を試料核酸断片およびハイブリッドDNA結合性電気化学活性分子を含む電解質溶液に浸漬し、次いで、カウンター電極を用いて、該電解質溶液中にて、ハイブリッドDNAが固定された基板とカウンター電極との間に電位を印加し、ハイブリッドDNA固定基板とハイブリッドDNA結合性電気化学活性分子との間を流れる電流を検出する一般的な「電気化学的な検出方法」とは異なる。その意味で、本発明の検出方法がいわゆる電気化学的なものではないことを断っておく。

【0024】[基板]基板としては、電気絶縁性の疎水性担体、あるいは電気絶縁性の低親水性の担体であることが好ましい。また、その表面が凹凸を有する平面性の低いものであっても好ましく用いることができる。基板の材質としては、ガラス、セメント、陶磁器等のセラミックスもしくはニューセラミックス、ポリエチレンテレフタート、酢酸セルロース、ビスフェノールAのポリカーボネート、ポリスチレン、ポリメチルメタクリレート等のポリマー、シリコン、活性炭、多孔質ガラス、多孔質セラミックス、多孔質シリコン、多孔質活性炭、織編物、不織布、涙紙、短纖維、メンブレンフィルター等の多孔質物質などを挙げることができるが、各種ポリマー、ガラスもしくはシリコンであることが特に好ましい。これは、表面処理の容易さや電気化学的方法による解析の容易さによるものである。基板の厚さは、特に限

定されないが、板状である場合には、100乃至1000μmの範囲にあることが好ましい。

【0025】基板としては、電極、光ファイバー、フォトダイオード、サーミスタ、ISFET、MOSFET、ピエゾ素子、表面弾性波素子なども好ましく用いることができる。例えば、電極の場合には、上記の導電性を持たない基板上に電極が配置されたものを用いることが好ましく、電極は、互いに接しないように、かつ規則的に配置されていることが好ましい。電極の材料としては、グラファイト、グラシーカーボン等の炭素電極、白金、金、パラジウム、ロジウム等の貴金属電極、酸化チタン、酸化スズ、酸化マンガン、酸化鉛等の酸化物電極、Si、Ge、ZnO、CdS等の半導体電極、チタンなどの電子伝導体を挙げることができるが、金もしくはグラシーカーボンを用いることが特に好ましい。これらの電子伝導体は、導電性高分子によって被覆されていても、単分子膜によって被覆されていてもよい。導電性を持たない基板上に複数の電極が配置されたものとしては、導電性を持たない基板の表面を上記の電子伝導体で処理したものを用いることが好ましく、金で蒸着処理したもの用いることが特に好ましい。基板は、電子伝導体で表面処理をする前に、基板上に電荷を有する親水性の高分子物質からなる層や架橋剤からなる層を設けてもよい。このような層を設けることによって基板の凹凸を軽減することができる。また、基板によっては、その基板中に電荷を有する親水性の高分子物質を含ませることも可能であり、このような処理を施した基板も好ましく用いることができる。

【0026】導電性を持たない基板上に複数の電極が配置されたものとしては、文献(Sosnowski,R.G. et al., Proc.Natl.Acad.Sci.USA, 94, 1119-1123(1997))に記載の、核酸が未固定のシリコンチップも好ましく用いることができる。また、プリント配線基板のように、が基板上に印刷されてなるものであってもよい。

【0027】[DNA断片] DNA断片は、目的によって二通りに分けることができる。遺伝子の発現を調べるために、cDNA、cDNAの一部、EST等のポリヌクレオチドを使用することが好ましい。これらのポリヌクレオチドは、その機能が未知であってもよいが、一般的にはデータベースに登録された配列を基にしてcDNAのライブラリー、ゲノムのライブラリーあるいは全ゲノムをテンプレートとしてPCR法によって増幅して調製する。PCR法によって増幅しないものも好ましく使用することができる。また、遺伝子の変異や多型を調べるには、標準となる既知の配列をもとにして、変異や多型に対応する種々のオリゴヌクレオチドを合成し、これを用いることが好ましい。さらに、塩基配列分析の場合には、4ⁿ (nは、塩基の長さ)種のオリゴヌクレオチドを合成したものを使用することが好ましい。DNA断片の塩基配列は、一般的な塩基配列決定法によって

予めその配列が決定されていることが好ましく、その塩基種も既知であることが好ましい。DNA断片は、3乃至50量体であることが好ましく、10乃至25量体であることが特に好ましい。DNA断片として、基板表面に区画された複数の領域のそれぞれに、互いに異なる塩基配列を有するDNA断片を固定させるため、そのような複数の種類のDNA断片を用いることも好ましい。

【0028】DNA断片の固定方法としては、公知の方法を用いることができる。DNA断片の基板への固定方法は、断片の種類および基板の種類に応じて適当な方法を選択することができる(蛋白質・核酸・酵素, Vol. 43, No. 13, 2004-2011(1998))。例えば、DNA断片がcDNAやPCR産物の場合には、DNAの荷電を利用して、ポリリシン、ポリエチレンイミン、ポリアルキルアミン等の陽イオンで表面処理した基板に静電結合させる方法を用いることができる。合成ヌクレオチドを固定する場合には、基板上で直接合成する方法、あるいは予め末端に共有結合のための官能基を導入したオリゴマーを合成し、表面処理した基板に共有結合させる方法を用いることができる。例えば、基板表面が金で蒸着処理されている場合には、DNA断片の5'もしくは3'末端にメルカプト基を導入し、金とイオウとの配位結合を介して、DNA断片を基板に固定する。該DNA断片にメルカプト基を導入する方法は、文献(M. Maeda et al., Chem.Lett., 1805-1808(1994)およびB.A. Connolly, Nucleic Acids Res., 13, 4484(1985))に記載されている。基板表面がグラシーカーボンで塗布処理されている場合には、そのグラシーカーボンを過マンガン酸カリウムで酸化することによって、基板表面にカルボン酸基が導入されるため、DNA断片をアミド結合により基板表面に固定することができる。実際の固定化方法については、文献(K.M. Millan et al., Analytical Chemistry, 65, 2317-2323(1993))に詳細が記載されている。上記のDNA断片は、予め調製された二本鎖DNA断片であってもよい。二本鎖DNA断片を金で蒸着処理された基板に固定する場合には、二本鎖DNA断片の片方の鎖の5'もしくは3'末端(好ましくは、5'末端)にメルカプト基を導入しておく。共有結合のための官能基としては、アミノ基、アルデヒド基、メルカプト基、ビオチン等を挙げることができる。基板としてガラスやシリコンを用いる場合には、その表面処理には、公知のシランカップリング剤を用いることが好ましい。

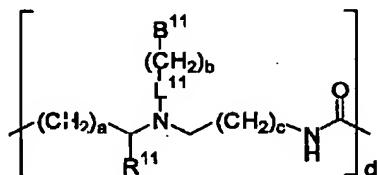
【0029】DNA断片の固定は、DNA断片が溶解あるいは分散されてなる水性液を基板上の領域に点着して行うことが好ましい。点着するDNA断片の濃度は、数pM乃至数mMの範囲にあることが好ましく、数pM乃至数nMの範囲にあることが特に好ましい。点着量は、1乃至100nLの範囲にあることが好ましく、1乃至10nLの範囲にあることが特に好ましい。DNA断片を含む水性液中には、その水性液の粘性を高める添加剤

を含有させてもよい。このような添加剤としては、ショ糖、ポリエチレングリコール、グリセロール等を挙げることができる。点着後、所定の温度でそのまま数時間放置するとDNA断片のが基板上の領域に固定される。点着の条件は、使用する基板の種類、大きさ等によって異なる。点着は、マニュアル操作によっても行うことができるが、汎用されているDNAチップ作製装置に装備されたスポットターを用いて行うことも好ましい。点着後は、インキュベーションを行うことも好ましい。インキュベート後、未点着のDNA断片を洗浄して除去することが好ましい。DNA断片を基板に固定後、その表面を、炭素原子数が1乃至6のアルキレン基の一方の末端に親水性基を有し、かつ他方の末端に基板と結合する官能基を有する化合物を用いて被覆処理をすることが好ましい。このような化合物としては、金が蒸着されている基板の場合には、2-メルカプトエタノールもしくはその誘導体を用いることができる。上記のようにして作製されたDNA分析素子の寿命は、数日間乃至数週間の範囲にある。

【0030】[PNA断片] 本発明で好ましく用いられるPNA断片は、下記一般式(I)で表される化合物である。

【0031】

【化2】(I)



【0032】式中、B¹¹は、リガンドであって、天然の核酸塩基(A、T、C、G、IもしくはU)あるいは塩基類似体を表す。B¹¹は、天然に見出される位置、即ち、アデニン、グアニンもしくはイノシンを含むプリンについては、9位において、チミン、ウラシルもしくはシトシンを含むピリミジンについては、1位において結合している。塩基類似体とは、天然に存在しない核酸塩基に類似の有機塩基をいい、プリン環やピリミジン環の一部がCからNへ、もしくはNからCへ置換された化合物、またはプリン環やピリミジン環の一部に新たな修飾を施された化合物(スルフヒドリル基やハロゲン原子が導入された化合物)をいう。また、B¹¹は、核酸塩基を含まない芳香族部分、炭素原子数が1乃至4のアルカノイル基、水酸基あるいは水素原子であってもよい。塩基類似体としては、7-デアザアデニン、6-アザウラシルおよび5-アザシトシンを挙げることができる。典型的な核酸塩基リガンドおよび例示的合成リガンドについては、WO92/20702に図示されており、5-アラビドリルチミンおよび3-デアザウラシルは、DNA断片への結合親和性を増加させることができることが知られている(特開

平11-236396号公報)。他の有用な天然にない核酸塩基としては、6-チオグアニンやピラゾロ[4,3d]-ピリミジンが有用である(国際出願PCT/US92/04795)。さらに、B¹¹は、DNAインターラーカレータ、レポータリガンド(例えば、フルオロフォア)、ハプテンやビオチンのタンパク質標識、スピニ標識、あるいは放射性標識であってもよい。B¹¹は、核酸塩基(A、T、C、GもしくはU)であることが特に好ましい。

【0033】R¹¹は、水素原子、もしくは天然のα-アミノ酸の側鎖を表す基を表す。天然のα-アミノ酸の側鎖を表す基としては、炭素原子数が1乃至6のアルキル基、炭素原子数が6乃至20のアリール基、炭素原子数が1乃至6のアルキル基を含む炭素原子数が7乃至26のアラルキル基、炭素原子数が6乃至20のヘテロアリール基、水酸基、炭素原子数が1乃至6のアルコキシ基、炭素原子数が1乃至6のアルキルチオ基、-NR¹³R¹⁴基、-SH基、および炭素原子数が1乃至6のアルキル基からなる群より選ばれる基であることが好ましい。炭素原子数が1乃至6のアルキル基は、さらに、水酸基、炭素原子数が1乃至6のアルコキシ基もしくは炭素原子数が1乃至6のアルキルチオ基で置換されていてもよい。R¹³およびR¹⁴は、互いに独立に、水素原子、炭素原子数が1乃至3のアルキル基、炭素原子数が1乃至3のアルコキシ基、炭素原子数が1乃至3のアルキルチオ基および水酸基からなる群より選ばれる原子もしくは水酸基を表す。天然のα-アミノ酸の側鎖を表す基は、R¹¹が結合している炭素原子の水素原子と一緒にになって脂環あるいは複素環を形成していてもよい。

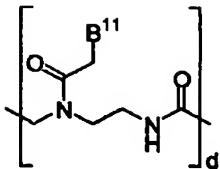
【0034】L¹¹は、連結基を表し、-CO-基もしくは-CO-NR¹²-基であることが好ましく、-CO-基であることが特に好ましい。R¹²は、水素原子、炭素原子数が1乃至4のアルキレン基、水酸基、炭素原子数が1乃至4のアルコキシ基およびアミノ基からなる群より選ばれる原子もしくは基を表す。炭素原子数が1乃至4のアルキレン基、炭素原子数が1乃至4のアルコキシ基およびアミノ基は、何れも炭素原子数が1乃至4のアルキル基、炭素原子数が1乃至4のアルコキシ基もしくは水酸基で置換されていてもよい。

【0035】dは、1乃至60の整数を表す。dは、1乃至40の整数であることが好ましい。a、bおよびcは、それぞれ独立に0乃至5の整数を表す。a、bおよびcは、何れも1であることが好ましい。

【0036】本発明で用いるPNA断片は、下記一般式(I I)で表される化合物であることが特に好ましい。式中、B¹¹およびdは、それぞれ、上記一般式(I)のB¹¹、dを表す。

【0037】

【化3】(I I)



【0038】PNA断片の基板への固定方法としては、公知の方法を用いることができる（蛋白質・核酸・酵素、Vol. 43, No. 13, 2004-2011(1998)、および特開平9-288080号公報）。固定方法は、PNA断片の種類および基板の種類に応じて適当な方法を選択することができる。例えば、基板上で直接、PNA断片を合成する方法、あるいは予め合成したPNA断片を基板表面に点着して、N末端もしくはC末端にて固定させる方法を用いることができる。基板の表面は、PNA断片を固定するために予め処理をしておくことが好ましい。別途合成したPNA断片を用いる場合には、合成したPNA断片の一方の末端に、基板との結合のための反応性基を導入しておくことも好ましい。反応性基としては、アミノ基、アルデヒド基、メルカプト基、ビオチン等を挙げることができる。基板の表面処理としては、例えば、基板がグラシーカーボンである場合には、基板を過マンガン酸カリウムで処理することが好ましい。導電性を持たない基板上に配置された複数の電極を基板として用いる場合には、基板表面のそれぞれに互いに異なる種類のPNA断片を固定することが好ましい。

【0039】PNA断片の固定は、PNA断片を含む水性液を基板上に点着して行うことが好ましい。点着後、所定の温度でそのまま数時間放置するとPNA断片のが基板表面に固定される。点着の条件は、使用する基板の種類、基板の大きさなどによって異なる。点着は、マニュアル操作によっても行うことができるが、汎用されているDNAチップ作製装置に装備されたスポットターを用いて行うことも好ましい。点着後は、インキュベーションを行うことも好ましい。インキュベート後、固定されていないPNA断片を洗浄して除去することが好ましい。上記のようにして作製されたPNA分析素子の寿命は、数日間乃至数週間の範囲にある。

【0040】[ハイブリダイゼーション]ハイブリダイゼーションは、DNAを用いる場合には、ハイブリッドDNA結合性電気化学活性分子の存在下にて、PNA分析素子を用いる場合には、ハイブリッドPNA結合性電気化学活性分子の存在下にて、DNA分析素子あるいはPNA分析素子に試料核酸断片を接触させることによって実施する。ハイブリッドDNA結合性電気化学活性分子は、ハイブリダイゼーションの終了後に、形成されたハイブリッドDNAに接触させてもよい。この場合には、ハイブリダイゼーションの終了後、界面活性剤（好ましくは、ドデシル硫酸ナトリウム）と緩衝液（好ましくは、クエン酸緩衝液）との混合溶液を用いて洗浄を行

い、未反応の試料核酸断片を除去しておくことが好ましい。または、ハイブリダイゼーションの際に試料核酸断片を含む水性液中に該電気化学活性分子を含めることによって、形成されたハイブリッドDNAに接触させてもよい。該電気化学活性分子は、（一本鎖の）試料核酸断片あるいは試料中に含まれる二本鎖の試料核酸断片に、該電気化学活性分子が非特異的に結合するのを避けるため、ハイブリダイゼーション終了後に未反応の試料核酸断片を除去してから、接触させることが望ましい。ハイブリッドPNA結合性電気化学活性分子についても同様である。ハイブリッドDNA結合性電気化学活性分子あるいはハイブリッドPNA結合性電気化学活性分子は、10nM乃至10mMの濃度範囲にて用いることが好ましい。ハイブリダイゼーションは、室温乃至70°Cの温度範囲で、そして0.5乃至20時間の範囲で実施することが好ましいが、基板に固定するDNA断片の鎖長、試料核酸断片の種類などに応じて、ハイブリダイゼーションの最適条件を設定することが望ましい。例えば、遺伝子発現の解析を目的とする場合には、低発現の遺伝子も充分に検出できるように、長時間のハイブリダイゼーションを行うことが好ましく、一塩基変異の検出を目的とする場合には、短時間のハイブリダイゼーションを行うことが好ましい。ハイブリダイゼーション終了後、界面活性剤（好ましくは、ドデシル硫酸ナトリウム）と緩衝液（好ましくは、クエン酸緩衝液）との混合溶液を用いて洗浄を行い、未反応の試料核酸断片を除去することが好ましい。

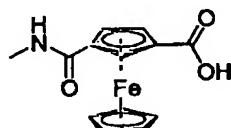
【0041】[試料核酸断片] 試料核酸断片としては、生物試料から抽出したDNA断片、遺伝子操作によって作製したDNA断片等を制限酵素等で切断し、次いで電気泳動による分離等で精製したDNA断片、あるいは化学合成で得られた一本鎖のDNA断片を用いることが好ましい。生物試料等から得られたDNA断片の場合には、熱処理あるいはアルカリ処理によって、一本鎖のDNA断片に解離させておくことが好ましい。制限酵素で切断を受けたDNA断片は、一般的に複数個の種類のDNA断片となるが、これを試料DNA断片として用いる場合のDNA断片は、一種類であっても複数個の種類であってもよい。試料DNA断片は、数pM乃至数mMの範囲にあることが好ましく、数pM乃至数nMの範囲にあることが特に好ましい。

【0042】[ハイブリッドDNA結合性電気化学活性分子およびハイブリッドPNA結合性電気化学活性分子] ハイブリッドDNA結合性電気化学活性分子は、ハイブリッドDNAに結合し、かつ電気活性活性を有する分子であれば何れのものも用いることができる。ハイブリッドDNAは、図1に示すように、DNA分析素子に試料核酸断片を接触させて得られるものであることが好ましいが、このような方法によらなくても、DNA分析素子に関与しない方法で別途調製されたものであっても

よい。DNA分析素子をPNA分析素子に置き換えた場合にも、上記と同様である。ハイブリッドDNA結合性電気化学活性分子（あるいはハイブリッドPNA結合性電気化学活性分子）は、DNA分析素子（PNA分析素子）を対応する電気化学活性分子を含む溶液に浸漬する方法、あるいはDNA分析素子（PNA分析素子）上に対応する電気化学活性分子を含む溶液を滴下する方法によって、ハイブリッドDNA（あるいはハイブリッドPNA）に接触させることができる。ハイブリッドDNAへの結合は、インターラート型、ハイブリッドへの溝（主溝もしくは副溝）結合型等の何れであってもよい。ハイブリッドPNA結合性電気化学活性分子は、ハイブリッドPNAに結合し、かつ電気活性活性を有する分子であれば何れのものも用いることができる。ハイブリッドPNAへの結合様式は、ハイブリッドDNAの場合と同様である。ハイブリッドDNA結合性電気化学活性分子およびハイブリッドPNA結合性電気化学活性分子は、何れも10nM乃至10mMの濃度範囲で用いることが好ましい。

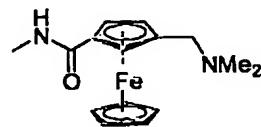
【0043】ハイブリッドDNA結合性電気化学活性分子およびハイブリッドPNA結合性電気化学活性分子としては、同一の分子を使用することができ、このような分子としては導電性基で標識された縫い込み型インターラートであることが特に好ましい。導電性基で標識された縫い込み型インターラートは、酸化還元活性を有する物質であることが好ましい。酸化還元活性部分としては、フェロセン化合物、カテコールアミン化合物、金属ビピリジン錯体、金属フェナントロリン錯体、ビオロゲン化合物等であることが好ましく、フェロセン化合物であることが特に好ましい。インターラート部分としては、ナフタレンジイミド、アントラセン、アントラキノン等であることが好ましく、ナフタレンジイミドであることが特に好ましい。よって、該インターラートは、フェロセンカルボン酸N-ヒドロキシスクシンイミドエステルと対応するアミン体との反応により合成され

(X1)



【0049】

(X3)



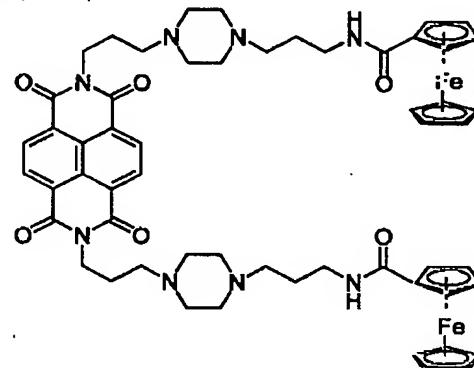
【0050】

【化8】

る下記式で表されるフェロセン化ナフタレンジイミド誘導体（S.Takenaka et al., J.Chem.Soc., Commun., 1111 (1998)）であることが特に好ましい。

【0044】

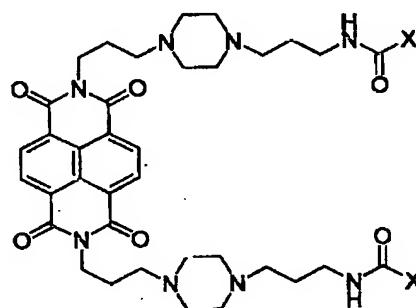
【化4】

(NDIFc₂-1)

【0045】また、下記式で表されるフェロセン化ナフタレンジイミド誘導体も好ましく用いられる。

【0046】

【化5】

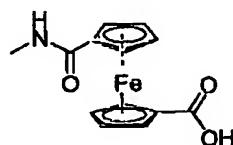


【0047】但し、Xは下記式で表されるフェロセン誘導体である。

【0048】

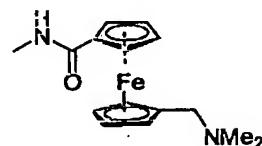
【化6】

(X2)

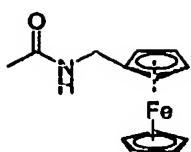


【化7】

(X4)



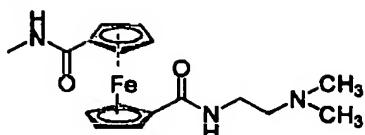
(X 5)



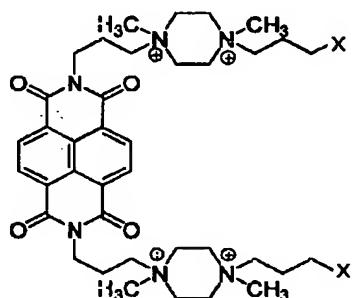
【0051】

【化9】

(X 6)



【0052】導電性基で標識された縫い込み型インター
カレータには、酸化還元活性部分とインタークレータ部
分とを繋ぐリンカー部分がある。前記式で表される1,
4-ジプロピルピペラジニル基がこのリンカー部分に相
(NDIFc₂-2)

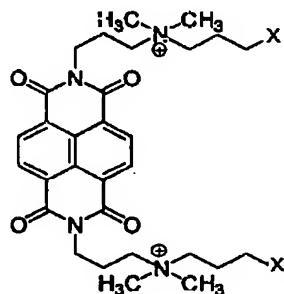


【0054】縫い込み型インタークレータとして上記の
ナフタレンジイミド誘導体を用いた場合、ナフタレンジ
イミド誘導体は、ハイブリッドDNAに高い特異性で結合
し、二塩基おきに配列してハイブリッドDNAに飽和
している。このことは、ナフタレンジイミド誘導体の二
つのフェロセン分子が、それぞれハイブリッドDNAの
主溝と副溝とに密に並んだ状態を意味している。このた
め、ナフタレンジイミド誘導体は、ハイブリッドDNA
からの解離速度が極めて遅くなり、ハイブリッドDNA
とナフタレンジイミド誘導体との安定な複合体を形成す
ることができる。また、ナフタレンジイミド誘導体のハ
イブリッドDNAへの結合がインタークレーションモ
ードであることは、一般的にハイブリッドDNAに該イン
タークレータを接触させたときに、粘度の変化が認めら
れることにより確認される。例えば、ウイルスSV40
に代表される閉環状プラスミドは、インタークレーション
が起こると、超らせんの変化に伴って粘度も変化す
ることが知られている。一方、該インタークレータは、一
本鎖DNA断片に対しては結合しないか、あるいは一旦
結合してもすぐに解離して遊離のインタークレータとな
る。

当する。このピペラジニル基の代わりに、四級化されたイミノ基を導入することもできる。四級化されたイミノ基を導入した下記式で表されるインタークレータは、反応系のpHに関わらずカチオン性となるために、ハイブリッドDNAあるいはハイブリッドPNAの結合がより強くなる。四級化されたイミノ基を導入したインタークレータは、PNA分析素子を用いる場合に特に有効である。リンカー部分に相当する基としては上記記載のものに限定されない。例えば、ピペラジニル基の代わりに、N-アルキル基（アルキル基としては、炭素原子数が1乃至6のアルキル基であることが好ましく、メチル基、エチル基もしくはn-プロピル基であることが特に好ましい）を導入することも好ましい。リンカー部分に相当する基の構造の違いより、フェロセン分子の酸化還元電位が異なる。

【0053】

【化10】

(NDIFc₂-3)

【0055】[応答電流の検出] DNA分析素子表面の
ハイブリッドDNA結合性電気化学活性分子結合領域に
発生する応答電流の検出は、走査型電気化学顕微鏡 (S
ECM) を用いて実施する。電流の検出は、ハイブリダ
イゼーション後のDNA分析素子を、ハイブリッドDN
A結合性電気化学活性分子を含む溶液に浸漬して接触さ
せたその溶液中でも実施しても、またはその溶液から該
DNA分析素子を引き上げて実施してもよい。PNA分析
素子を用いる場合にも同様である。

【0056】走査型電気化学顕微鏡 (SECM) は、一
般的には探針 (プローブ) /サンプル固定台、バイポテ
ンショット、高解像度データ処理および三次元マイ
クロポジショナーから構成されている。走査型電気化学
顕微鏡 (SECM) は、装備された探針を用いて微小な
基板のx-y平面をスキャンし、基板表面の近傍の化学的
な変化 (酸化還元反応) を三次元のSECM画像図と
して与える特徴を有したシステムの総称である。「顕微
鏡」とは、一般的に微小な基板上の変化を画像図として
アウトプットすることを示す。よって、このような特徴
を有したシステムであれば、何れのシステムも走査型電
気化学顕微鏡 (SECM) に含まれる。三次元SECM

画像は、実際には探針位置の関数として探針電流を観測して得られる。探針としては、絶縁性のガラス、ポリマーに埋包された貴金属あるいはカーボンファイバー微小電極が用いられる。

【0057】試料核酸断片が未知の濃度で溶解あるいは分散されてなる水性液を用いて、該水性液中の、DNA分析素子に固定されているDNA断片と相補性を有する試料核酸断片の濃度を定量することができる。代表的な例としては、まず、DNA分析素子に、濃度が未知の、該分析素子に固定されているDNA断片と相補性を有する試料核酸断片が溶解あるいは分散されてなる試料水性液およびハイブリッドDNA結合性電気化学活性分子を接触させる。次に、該分析素子に走査型電気化学顕微鏡によって電位を付与し、分析素子表面のハイブリッドDNA結合性電気化学活性分子結合領域に発生する電流を測定する。そして、その電流値を、上記と同一の試料核酸断片が溶解あるいは分散されてなる試料水性液の濃度と電流との関係を示す検量線と照合することによって、試料水性液中の相補性を有する試料核酸断片の濃度を求める。試料核酸断片を1乃至100nMの濃度の範囲で溶解あるいは分散してなる試料水性液を用いて行なうことが好ましい。上記検量線は、DNA分析素子に、該分析素子に固定されているDNA断片と相補性を有する試料核酸断片を互いに異なる既知の濃度で含む試料核酸断片が溶解あるいは分散されてなる三点以上の各試料水性液をそれぞれ接触させて、次いで該分析素子に走査型電気化学顕微鏡によって電位を付与しながら、該分析素子表面のハイブリッドDNA結合性電気化学活性分子結合領域に発生する電流を測定することによって予め作成されたものであることが好ましい。

[0058]

【実施例】[実施例1]ハイブリッドDNAが固定されたDNA分析素子を用いる検出

(1) DNA分析素子の作製

金を蒸着した一辺が 2×10^3 (μm) のガラス基板に、5'末端にメルカプトヘキシル基を有するアデニンの20量体とチミンの20量体とからなるハイブリッドDNA (HS-DNA : $A_{20}T_{20}$) (50 nM) の水溶液 (1 nL) をスポットー装置を用いて点着し、さらに、同じガラス基板に濃度を25 nMおよび12.5 nMに変えたHS-DNAの水溶液をそれぞれ1 nLずつ点着し、点着した水溶液が乾燥しないようにして1時間放置した後、固定されなかったHS-DNAを蒸留水で洗浄して、DNA分析素子を作製した。

(2) 試料DNA断片の検出

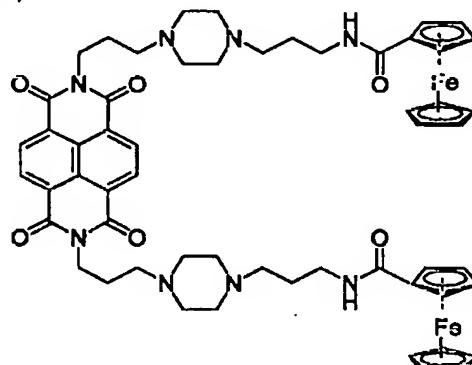
上記(1)で作製したDNA分析素子を、特開平9-288080号公報に記載の方法に従って合成した下記式で表されるフェロセン化ナフタレンジイミド(50 μM)を含む電解質溶液(0.1 M酢酸/酢酸カリウム水溶液(pH 5.6)-0.1 M塩化カリウム水溶液の混

合液)に浸漬し、この基板表面にモデル900走査型電気化学顕微鏡(CH インスツルメンツ社製)を用いて、0.7Vのプローブ電位を印加し、その表面を走査速度が0.002秒およびプローブの基板からの高さが約20μmの条件にて測定した。図2は、この測定結果を画像化した三次元SECM像であり、応答電流の値が 6.51×10^{-11} (A)(図2の黒色に相当)～約 1.20×10^{-8} (A)(図2の灰色に相当)の範囲にあることを示している。図3は、図2のプロファイル図である。(1)、(2)および(3)は、それぞれ基板にHS-DNAの水溶液を50、25、12.5nMの濃度で点着した部分(同じ濃度のHS-DNAの水溶液を基板の横方向に二列ずつ点着)を示し、何れの部分にも 1.20×10^{-8} (A)相当の応答電流が検出されたことが分かる。よって、 $12.5 \times 10^{-18} \sim 50 \times 10^{-18}$ モルの範囲の量のハイブリッドDNAを検出することができる。

(0059)

【化 1 1】

(NDIFc₂-1)



【0060】[参考例]ハイブリッドDNA(HS-DNA)を一本鎖DNA断片(HS-dA₂₀)に変える以外は実施例1と同様の操作を行い、基板表面を測定した。図2の(1')、(2')および(3')は、HS-dA₂₀の水溶液をそれぞれ50、25、12.5nMの濃度で点着した部分示す。このことから、基板表面の凹凸等が原因して高い応答電流が検出された領域もあるが、一本鎖DNA断片については、ハイブリッドDNAの場合の約1/1000程度の電流量しか検出されなかつたことが分かる。

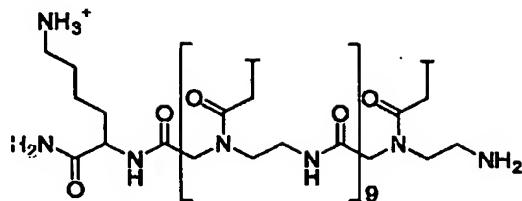
【0061】[実施例2] ハイブリッドPNAが固定されたPNA分析素子を用いる検出

(1) PNA分析素子の作製

下記式で表される PNA 断片: PNA-H₂N-Lys-T₁₀-H (以下「PNA-T₁₀」という。) を、文献 (P.E.Nielsen et al., Journal of American Chemical Society, 114, 1895-1897(1992) および 114, 9677-9678(1992)) に記載の方法に従って合成した。T は、チミンを表す。

【0062】

【化12】



【0063】表面にメルカプト基を有する面積が 2.25 mm^2 の金電極に、1, 2-ビース(ビニルスルホニルアセトアミド)エタンのリン酸緩衝液を滴下して得られる、一方の端部のビニルスルホニル基が遊離な金電極に、50 nMのPNA断片(PNA-T₁₀)と50 nMのアデニンの10量体(DNA-A₁₀)との混合溶液(1 nL)を滴下し、室温で1時間放置し、電極に固定されなかったPNA-T₁₀とDNA-A₁₀とのハイブリッドPNAを蒸留水で洗浄してPNA分析素子を作製した。

(2) 試料DNA断片の検出

実施例1のDNA分析素子の代わりに上記(1)で作製したPNA分析素子を用いて、実施例1の(2)と同様の操作を行い、応答電流を測定したところ、実施例1で得られた三次元SECM像に示す結果とほぼ同様な結果が得られた。

【0064】【実施例3】一本鎖DNA断片が固定されたDNA分析素子を用いる検出

(1) DNA分析素子の作製

金を蒸着した一辺が $2 \times 10^3 (\mu\text{m})$ のガラス基板に、5'末端にメルカプトヘキシル基を有するアデニンの20量体(HS-DNA: A₂₀)(50 nM)の水溶液(1 nL)をスポットター装置を用いて点着し、点着した水溶液が乾燥しないようにして1時間放置した後、固定されなかったHS-DNAを蒸留水で洗浄して、DNA分析素子を作製した。

(2) 試料DNA断片の検出

上記(1)で作製したDNA分析素子の上に、チミンの20量体(DNA: T₂₀)(100 nM)を含む10 mMトリス緩衝液(pH 7.5)溶液の10 μLを滴下し、その溶液が乾燥しないようにしながら25°Cにて2時間インキュベートした。インキュベート後、分析素子表面を0.1 Mリン酸二水素ナトリウム-リン酸水素二ナトリウム水溶液(pH 7.0)にて洗浄し、未反応のチミンの20量体を除去した。次いで、実施例1の(2)と同様にして応答電流を測定したところ、実施例1で示した三次元SECM像における、50 nMのHS-DNAの点着スポットとほぼ同様の結果が得られた。

【0065】【実施例4】PNA断片が固定されたPNA分析素子を用いる検出

(1) PNA分析素子の作製

表面にメルカプト基を有する面積が 2.25 mm^2 の金

電極に、1, 2-ビース(ビニルスルホニルアセトアミド)エタンのリン酸緩衝液を滴下して得られる、一方の端部のビニルスルホニル基が遊離な金電極に、50 nMのPNA-T₁₀(PNA-T₁₀については、実施例2に記載)の水溶液(1 nL)を滴下し、室温で1時間放置し、電極に固定されなかったPNA-T₁₀を蒸留水で洗浄してPNA分析素子を作製した。

(2) 試料DNA断片の検出

上記(1)で作製したPNA分析素子の上に、アデニンの10量体(DNA: A₁₀)(100 nM)を含む10 mMトリス緩衝液(pH 7.5)溶液の10 μLを滴下し、その溶液が乾燥しないようにしながら25°Cにて2時間インキュベートした。インキュベート後、分析素子表面を0.1 Mリン酸二水素ナトリウム-リン酸水素二ナトリウム水溶液(pH 7.0)にて洗浄し、未反応のアデニンの10量体を除去した。次いで、実施例1の(2)と同様にして応答電流を測定したところ、実施例1で示した三次元SECM像における、50 nMのHS-DNAの点着スポットとほぼ同様の結果が得られた。

【0066】

【発明の効果】本発明の走査型電子顕微鏡を用いる検出方法によって、いわゆる電気化学的な手段によらず、ハイブリッドDNAの形成を示す電気的な信号を検出することができる。即ち、本発明によって、DNA分析素子に固定されているDNA断片と相補性を有する、試料核酸断片を簡便に検出することが可能で、多数の試料核酸断片を同時に検出することもできる。試料中の試料核酸断片の濃度の定量も可能である。また、本発明は、DNAセンサに通常備えられている出力端子(特開平9-288080号公報)を必要とせず、また検出対象の試料核酸断片に特別の標識をする必要もない。さらに、PNA分析素子を用いた場合にも、上記のDNA分析素子の場合と同様に、試料核酸断片の簡便な検出および定量が可能である。特に、PNA分析素子を用いる方法では、PNA断片と試料核酸断片との電気的な反発が抑えられるために、より効率のよいハイブリダイゼーションが可能となる。ハイブリッドを形成していないPNA断片とハイブリッドPNA結合性電気化学活性分子との結合を回避するために、より感度のよい検出が実現できる。

【図面の簡単な説明】

【図1】本発明の代表的な試料核酸断片の検出方法を示す模式図である。

【図2】ハイブリッドDNAに結合したハイブリッドDNA結合性電気化学活性分子とDNA分析素子表面との間を流れる電流の検出を示す走査電気化学顕微鏡による三次元SECM像である。

【図3】三次元SECM像のプロファイル図である。

【符号の説明】

1 1 DNA断片

1 2 a DNA断片と相補性を有する試料核酸断片

21 試料核酸断片

31 DNA分析素子

41 ハイブリッドDNA結合性電気化学活性分子

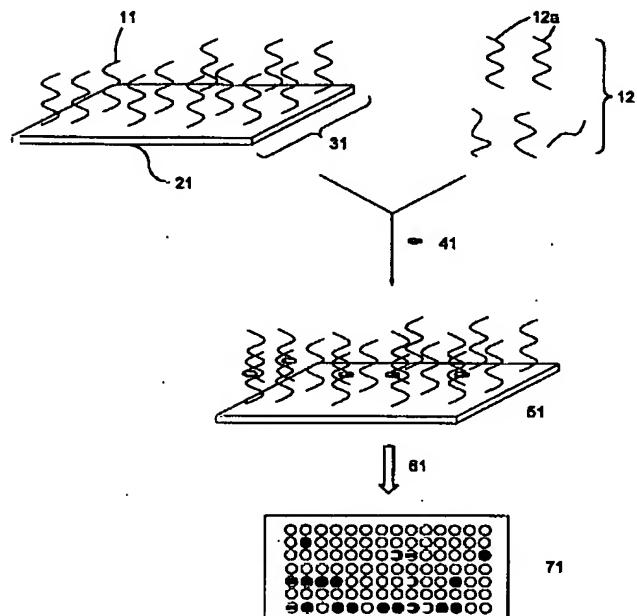
51 基板に固定されたハイブリッドDNAにハイブリ

ッドDNA結合性電気化学活性分子が結合してなる複合体

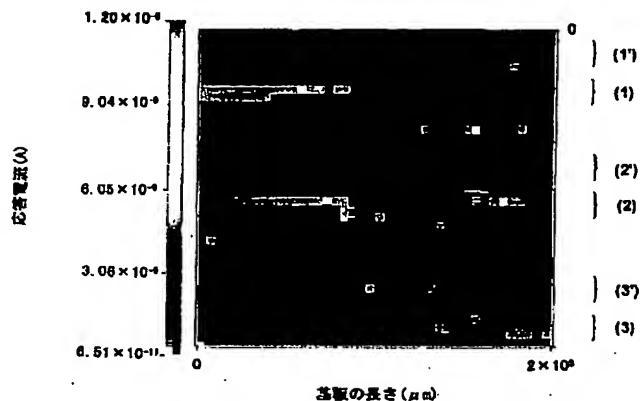
61 走査型電気化学顕微鏡

71 三次元画像図

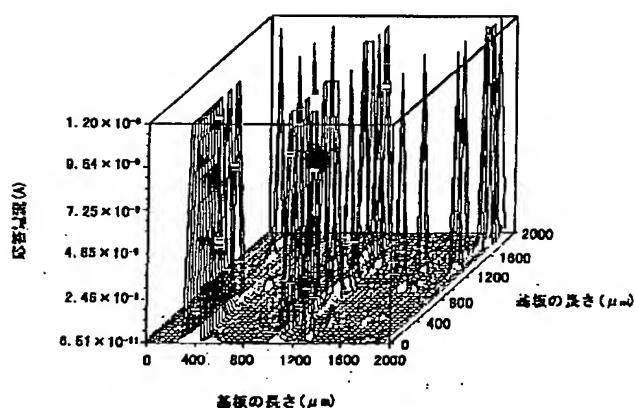
【図1】



【図2】



【図3】



BEST AVAILABLE COPY

フロントページの続き

(51) Int. Cl. 7

G 01 N 33/566
33/58

識別記号

F I

G 01 N 33/58

(参考)

C 12 N 15/00

A

G 01 N 27/46

A

336 B

(14) 2001-13103 (P2001-13103A)

(72) 発明者 小川 雅司
東京都港区西麻布2丁目26番30号 富士写
真フィルム株式会社内
(72) 発明者 竹中 繁織
福岡県古賀市舞の里4-23-21

(72) 発明者 山下 健一
福岡県福岡市城南区堤団地17-104
(72) 発明者 高木 誠
福岡県福岡市博多区昭南町3-4-29